Immunoelektrophoretische Untersuchungen auf Acetatfolien

von

WOLFGANG GRABNER

aus Erlangen

1966

1966 W 104

Aus der MEDIZINISCHEN KLINIK der
FRIEDRICH-ALEXANDER-UNIVERSITÄT
ERLANGEN-NÜRNBERG

Direktor: Prof. Dr. N. Henning

IMMUNOELEKTROPHORETISCHE UNTERSUCHUNGEN AUF ACETATFOLIEN

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Friedrich-Alexander-Universität
zu
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Wolfgang Grabner
aus Erlangen
1966

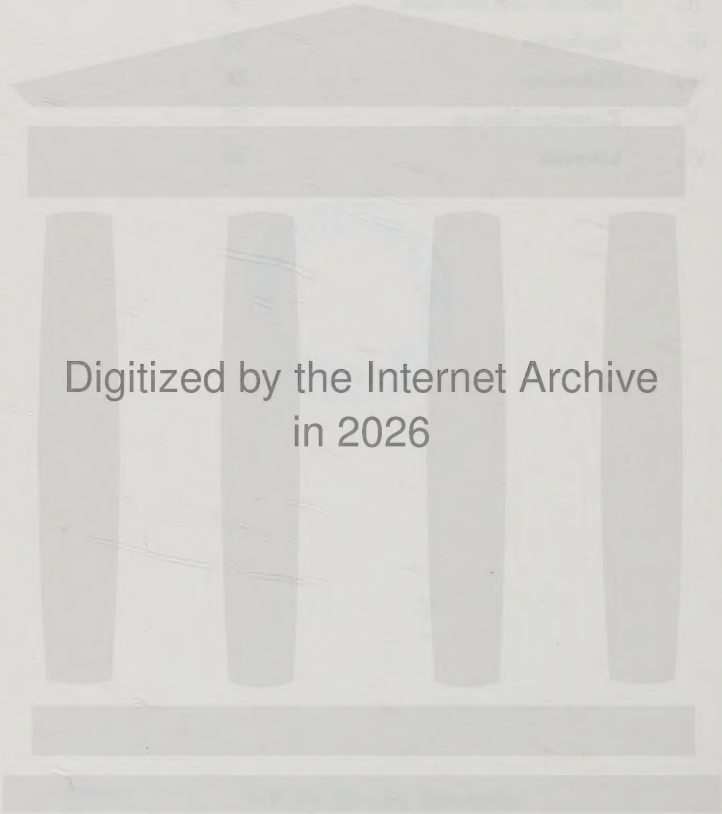
Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg

Dekan: Prof. Dr. Dr. G. Steinhardt
Referent: Prof. Dr. N. Henning

Tag der mündlichen Prüfung: 30. März 1966

Inhaltsübersicht

I.	Einleitung	1
II.	Material und Methodik	2
III.	Ergebnisse	12
IV.	Diskussion	24
V.	Zusammenfassung	29
VI.	Literatur	30



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535727_0060

Einleitung

Die Immunoelektrophorese stellt eine Kombination der elektrophoretischen Auftrennung von antigenen Eiweißgemischen und der Immunodiffusion präzipitierender Antikörper dar. Sie wurde von P. GRABAR und C. A. WILLIAMS in die klinische Diagnostik eingeführt und ist heute zu einer Routinemethode immunologischer Untersuchungen geworden. Ihr Anwendungsbereich erstreckt sich vorwiegend auf die Differenzierung von Proteinen.

Agar als Trägermedium für Immunoelektrophoresen ist auch heute noch die Methode der Wahl. 1956 wies jedoch J. KOHN in England auf Zellulose-Acetat als Trägermaterial für elektrophoretische Auftrennungen hin (12). Er berichtete mehrfach über Erfahrungen mit der englischen Oxofolie (Hersteller Fa. COURTAULDS Ltd., London), die sich nicht nur für die üblichen Serumelektrophoresen, sondern auch für Immunoelektrophoresen eigne (11, 12,14).

In der Zwischenzeit werden auch in Deutschland Membranfolien für elektrophoretische Analysen hergestellt (Hersteller MEMBRANFILTERGESELLSCHAFT GmbH, Göttingen und Fa. C. SCHLEICHER & SCHÜLL, Dassel) und bereits in vielen Kliniken für Routineuntersuchungen verwendet.

Über die Anwendung dieser Membranfolien bei Immunoelektrophoresen werden im deutschen Schrifttum bis auf eine Arbeit von H. SÜDHOF (21) keine Erfahrungen mitgeteilt.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit ist es, die Eignung von Zellulose-Acetat-Folien für Immunoelektrophoresen zu prüfen und eine geeignete Methode für klinische Untersuchungen unter besonderer Berücksichtigung der Lipoproteiddarstellung zu entwickeln.

Material und Methodik

A. Material

1. Membranfolien:

   Verwendet wurden Folien der Firma Carl SCHLEICHER & SCHÜLL, Dassel. Die Abmessungen betrugen 39 x 155 mm.

2. Auftragestempel:

   Zum Auftragen des Serums wurde ein Stempel konstruiert (Abb. 1), der aus einem Bügel mit zwei parallel verbundenen Drähten besteht und durch einen Federmechanismus in einem Kunststoffrahmen bewegt werden kann. Die Länge der beiden Drähte beträgt 10 mm, ihr gegenseitiger Abstand 1 mm. Diese Größen hatten sich bei Voruntersuchungen als zweckmäßig erwiesen.

   Die Serumprobe wird mittels Pipette auf diese Metalldrähte gebracht, so daß sie durch Stempeldruck gleichmäßig auf die Folie aufgetragen werden kann.

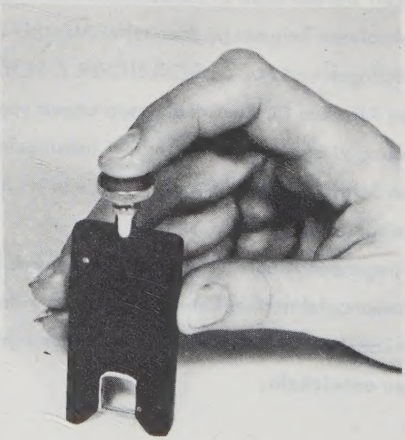


Abb. 1. Stempel zum Auftragen der Serumproben

3. Folienträger:

Verwendet wurden Folienträger für Immunokammern der Firma BENDER & HOBEIN, München.

4. Elektrophoresekammer:

An die zur Trennung des Serums benutzte Kammer sind folgende Anforderungen zu stellen:

a) die Verdunstung von Wasser aus dem Puffer und von der Folienoberfläche ist weitgehend zu vermeiden

b) Verhinderung größerer Elektrolytverschiebungen während des Trennvorganges

c) Einstellung einer konstanten, nicht zu hohen Temperatur während des Trennvorganges.

Eine Elektrophoresekammer, die diesen Anforderungen weitgehend genügt, ist die Immunokammer der Firma BENDER & HOBEIN, München, die für die Trennung verwendet wurde.

5. Stromquelle:

Als Stromquelle diente ein selbst konstruiertes Gerät (Abb. 2 a). Es handelt sich hierbei im Prinzip um einen Gleichrichter mit Gleichspannungsstabilisierung und liefert den für die Trennung erforderlichen Strom. Die gewünschte Ausgangsspannung läßt sich mittels eines Potentiometers einstellen. Die optische Anzeige erfolgt über das parallel geschaltete Voltmeter. Der Vorteil des Gerätes besteht im Gegensatz zu anderen Konstruktionen im geringen Kostenaufwand.

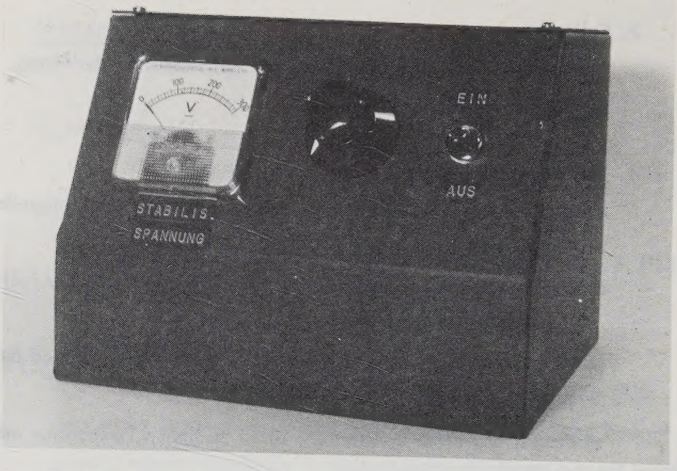


Abb. 2 a. Netzanschlußgerät mit Gleichspannungsstabilisierung.
Maximale Ausgangsbelastung 40 mA

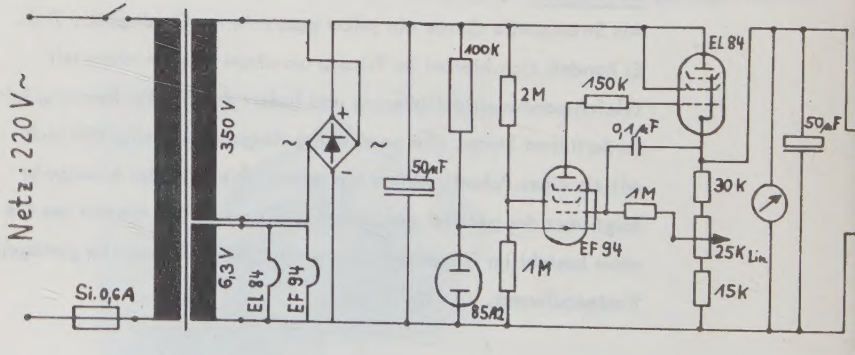


Abb. 2 b. Schaltskizze des Netzanschlußgerätes

6. Feuchte Kammer:

Für die Immunodiffusion der präzipitierenden Antikörper wurden mit feuchtem Filtrierpapier ausgekleidete, luftdicht abgeschlossene Glaskammern verwendet.

7. Kunststoffschalen:

Mit physiologischer NaCl-Lösung gefüllte Kunststoffschalen werden benötigt, um das überschüssige Serumeiweiß nach erfolgter Präzipitation auszuwaschen.

8. Trockenständer:

Der in Abb. 3 gezeigte Trockenständer aus Metall wurde selbst hergestellt. Er dient zum Aufspannen der Membranfolien vor dem Trocknen im Trockenschrank. Das Gerät läßt sich für jede Foliengröße beliebig verstellen. Mittels zweier Klammern und Kunststoffbrücken werden die Folien fixiert.

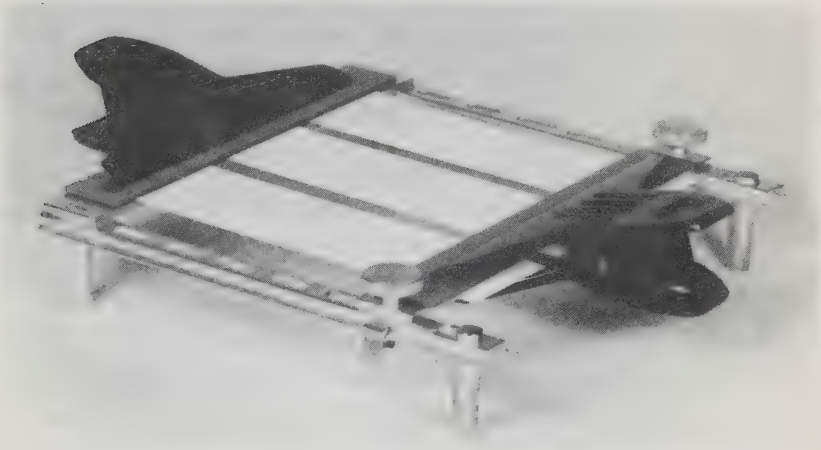


Abb. 3. Trockenständer zum Trocknen der Folien

9. Reagenzien:

a) Puffer:

Zum Tränken der Membranfolien mit Pufferlösung ist ein Veronal-Acetat-Puffer mit einem p_H von 8,6 in der Verdünnung von 1:1 zu empfehlen, dem als Konservierungsmittel einige Tropfen 4 ‰ iges Merfen (Phenylhydrarg. boric.) zugesetzt wurden.

b) Physiologische Kochsalzlösung:

Nach dem Diffusionsvorgang wurden die Folien in physiologischer Kochsalzlösung ausgewaschen.

c) Farblösung:

Beim Anfärben der Präzipitationslinien zeigte sich eine gesättigte Lösung von Amidoschwarz 10B (Hersteller Fa. BAYER) in einem Gemisch von Methanol und Eisessig im Verhältnis 9:1 als am besten geeignet.

d) Entfärbelösung:

Entfärbt wurden die Folien mit einer Methanol-Eisessig-Mischung ebenfalls im Verhältnis 9:1

e) Transparenzflüssigkeit:

Zum Transparentmachen der Folien diente Eisessig, der mittels eines Zerstäubers auf die entfärbte, noch feuchte Folie aufgesprüht wurde.

B. Methodik

1. Präparation der Folien:

Grundsätzlich sollten Membranfolien während des Arbeitsvorganges nie mit den Fingern berührt werden!
Man setzt der Pufferlösung unmittelbar vor dem Anfeuchten der Folien (Format 39 x 155 mm) einige Tropfen Merfen zu. Darauf faßt man die Folie mittels zweier Deckglaspinzetten an ihren beiden Enden und legt sie flach auf die Pufferlösung. Durch kapillaren Sog wird die Folie von unten benetzt. Nach vollständiger Durchtränkung wird der Streifen mit einer Pinzette eingetaucht. Anschließend wird die Folie herausgenommen, auf eine Glasplatte gelegt und unter Abrollen eines mit Filtrierpapier bespannten Löschers von überflüssiger Feuchtigkeit befreit. Es ist besonders darauf zu achten, daß eine optimale Feuchtigkeit resultiert, die nur durch Erfahrung richtig eingeschätzt werden kann. Zu starkes Trocknen ist zu vermeiden.

2. Auftragen des Serums:

Zunächst wird die Auftragestelle in 3,5 cm Abstand vom rechten Rand mit einem Kugelschreiber markiert. Gleichzeitig erfolgt die Kennzeichnung der Folie unter Angabe der notwendigen Daten (Name des Patienten, aufgetragene Serummenge, Datum). Die markierte Startlinie sollte eine Länge von 10 mm aufweisen und beidseitig je 5 - 8 mm vom aufgelegten Antiserumstreifen entfernt sein (Abb. 4).

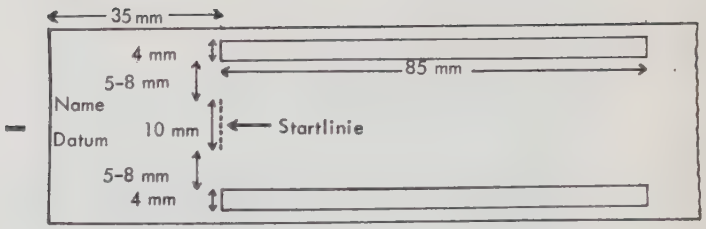


Abb. 4. Modell einer beschickten Membranfolie

Die mit einer Pipette abgemessene Serummenge von 4×10^{-3} bis 6×10^{-3} ml wird auf den Auftragestempel gebracht, so daß sich das Serum als dünner Film zwischen den parallel verlaufenden Metalldrähten ausspannt. Durch leichten Stempeldruck wird das Serum am Markierungsstrich aufgetragen.

3. Spannen der Folien:

Nach dem Auftragen des Serums werden die Folien mit Deckglaspinzetten auf Immunobrücken gelegt und an beiden Enden mit puffergetränkten Filtrierpapierkontakten versehen. Die Filtrierpapierverbindungen werden nun so fest an die Außenseiten der Streifenhalter gepreßt, bis eine optimale Folienspannung erreicht ist.

4. Elektrophoretische Trennung:

Die Trennung des Serums wird bei Zimmertemperatur durchgeführt. Nach Einsetzen der Folienträger in die Immunokammer

erfolgt die elektrophoretische Auftrennung. Die besten Ergebnisse wurden unter folgenden Trennbedingungen erzielt:

Trennzeit	:	2 Std. 20 Min.
Gleichspannung	:	200 Volt
Stromstärke	:	7 - 9 mA
Ionenstärke	:	0,05

Gleiche Ergebnisse konnten mit einer Gleichspannung von 180 Volt und einer Trennzeit von 2 Std. 45 Min. erreicht werden.

5. Immunodiffusion:

Nach beendeter Elektrophorese werden zwei Filtrierpapierstreifen (Whatman No. 1) mit Anti-Serum beschickt und beidseitig parallel zur Laufstrecke der getrennten Serumfraktionen aufgelegt. Für die gewöhnlichen Immunoelektrophoresen ist ein Streifenformat von 4 mm x 85 mm, für die Darstellung einzelner Lipidfraktionen Streifenformate von 4 mm x 60 mm am besten geeignet. Vergleichende Untersuchungen ergaben, daß für die aufgetragenen Serummengen von 4×10^{-3} bis 6×10^{-3} ml Antiseren in einer Menge von 4×10^{-2} bis 6×10^{-2} ml zur optimalen Präzipitationsbildung erforderlich sind. Das Verhältnis von Serum zu Antiserum beträgt demnach 1:10. Das Antiserum in einer Verdünnung 7:2 oder 7:3 liefert gleichwertige Resultate.
Die mit Antiserum getränkten Filtrierpapierstreifen müssen mit zwei Pinzetten vorsichtig auf die Folienränder gelegt werden. Anschließend wird der Folienträger in eine feuchte Kammer gestellt. Es ist sorg-

fältig darauf zu achten, daß alle Streifen vor dem Diffusionsprozeß nochmals nachgespannt werden und die Immunobrücke waagerecht in der Kammer steht. Selbst eine minimale Abweichung von der Horizontallage führt zu Artefakten und ungenauen Ergebnissen. Deshalb sollte die Lage der Immunobrücke stets mit der Wasserwaage geprüft werden. Die Diffusion erfolgt bei Zimmertemperatur. Temperaturschwankungen sind in jedem Falle zu vermeiden. Die optimale Diffusionszeit liegt zwischen 40 und 48 Stunden.

6. Wässern und Trocknen der Folien:

Nach beendeter Immunodiffusion werden die Streifen der feuchten Kammer entnommen und in mehreren Bädern physiologischer Kochsalzlösung von überschüssigem Eiweiß befreit. Das Wässern sollte 10 bis 15. Min. unter leichtem Hin- und Herbewegen der Folien durchgeführt werden. Anschließend kommen die Streifen auf einen Trockenständer (Abb. 3) und werden bei einer Temperatur von 100° C im Trockenschrank 7 Min. lang getrocknet.

7. Färbung und Entfärbung:

Die getrockneten Streifen läßt man flach auf das Färbebad (Amidoschwarz 10B) fallen. Erst nach völliger Benetzung taucht man sie unter. Eine Färbedauer von 5 bis 10 Min. ist ausreichend. Darauf werden die Folien in Methanol-Eisessig unter mehrmaligem Bäderwechsel etwa 15 Min. lang entfärbt.

8. Transparentmachen der Folien:

Nach dem Entfärben werden die Folien mit Hilfe einer Gummirolle blasenfrei auf Glasplatten aufgezogen. Dabei müssen die Streifen unbedingt feucht bleiben. Nun wird die Glasplatte schräg unter dem Abzug aufgestellt und mit Eisessig bis zur Durchsichtigkeit besprüht. Dazu benutzt man ein Reagenzglas oder eine Glasflasche mit Zerstäuber und angeschlossenem Gebläse. Anschließend werden die Folien bei 100° C innerhalb von 15 bis 20 Min. getrocknet.

Ergebnisse

Mit der beschriebenen Technik wurden immunoelektrophoretische Analysen normaler und pathologischer Seren auf Membranfolien unter Verwendung von Anti-Humanseren vorgenommen. Ferner sollte die Brauchbarkeit der Methode zur Darstellung der Serum-Lipoproteide unter Verwendung spezifischer Anti-Lipoproteidseren geprüft werden.

A. Immunoelektrophoretische Analysen normaler und pathologischer Seren

Das kasuistische Material umfaßte 40 Fälle, an denen insgesamt rund 500 Einzeluntersuchungen ausgeführt wurden. Darin enthalten sind die Einzelversuche zur Feststellung günstiger Auftrage- und Trennbedingungen, zur Prüfung der geeigneten Pufferverdünnung, zur Testung der optimalen Serum- und Antikörpermengen, der erforderlichen Diffusionszeit sowie der Weiterbehandlung nach erfolgter Präzipitatbildung mit nachfolgender Färbung.

Aufgrund dieser Analysen sind für die praktische Ausführung folgende Punkte zu beachten:

Für Immunoelektrophoresen auf Folien eignen sich die von der Firma C. SCHLEICHER & SCHÜLL hergestellten Membranfolien.

Nach den vorliegenden Untersuchungen sowie nach Angaben von K. H. MAIER und K. VOGGEL (15) bestehen ihre Hauptvorzüge in hervorragender Trennschärfe, Adsorptionsfreiheit, kurzen Trennzeiten und exakter Auswertung durch vollkommene Transparenz.

Die technische Ausführung ist mit einfachen Mitteln möglich. Das gilt vor allem für Stromquelle, Trennkammer und feuchte Kammer. Empfehlenswert ist die Benutzung eines Stempels zum Auftragen der Serumproben, eines Trockenständers mit Spannvorrichtung und eines

Zerstäubers zum Transparentmachen der Folien.

Es ist besonders darauf zu achten, daß folgende technische Einzelheiten sorgfältig eingehalten werden:

a) Die Folien dürfen nie mit den Fingern berührt werden.

b) Beim Anfeuchten muß die Entstehung von Lufteinschlüssen verhindert werden.

c) Die getränkte Folie soll zwar von überschüssiger Feuchtigkeit befreit werden, jedoch ist zu starkes Trocknen zu vermeiden.

d) Beim Beschicken der Acetatstreifen sind die in der Methodik angegebenen Maße genau einzuhalten.

e) Exakte Ergebnisse können nur bei Einhaltung optimaler Trennbedingungen erzielt werden.

f) Wichtig ist die horizontale Lage der Streifenhalter und der Feuchtigkeitsgehalt in der feuchten Kammer.

g) Die Diffusionszeit sollte mindestens 40 Stunden betragen, um eine genügende Anzahl Präzipitationslinien zu erhalten.

h) Nach erfolgter Immunodiffusion sollten die Folien stets 15 Min. gewässert werden.

Bei den immunoelektrophoretischen Analysen normaler und pathologischer Seren konnten unter genauer Einhaltung der genannten Technik und der Verwendung von IEP-ANTI-HUMANSERUM vom Pferd (Hersteller HYLAND LABORATORIES, Los Angeles) bis zu 20 Präzipitationslinien dargestellt werden.

Als Beispiele für die Qualität der durchgeführten Analysen sind nachfolgende Resultate angeführt (Abb. 5 bis Abb. 8).

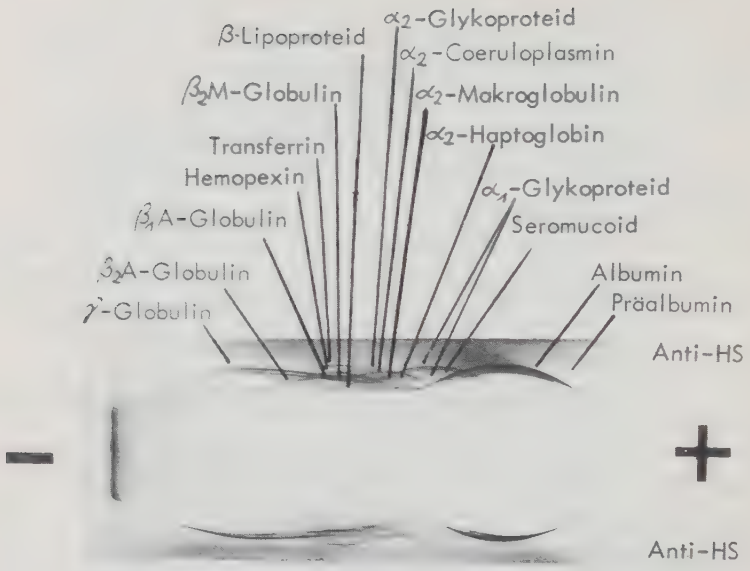


Abb. 5. Immunoelektrophorese eines Normalserums

Folienformat	:	39 mm x 155 mm
Veronalpuffer	:	p_H 8,6
		Ionenstärke 0,05
		Verdünnung 1:1
Serum	:	5×10^{-3} ml
IEP-Anti-Humanserum	:	5×10^{-2} ml (Verd. 7:2)
Trennzeit	:	160 Min.
Gleichspannung	:	200 Volt
Diffusionszeit	:	48 Std.

Abb. 6. Gamma-Myelom (Pat. Ze., 70 J.)

Das Gamma-Myelom stellt sich durch die außen liegende Myelomfraktion bei Spaltung der Gamma-SS-Linie dar.

Folienformat	:	39 mm x 155 mm
Veronalpuffer	:	p_H 8,6 Ionenstärke 0,05 Verdünnung 1:1
Serum	:	5×10^{-3} ml
IEP-Anti-Humanserum	:	5×10^{-2} ml (unverdünnt)
Trennzeit	:	150 Min.
Gleichspannung	:	200 Volt
Diffusionszeit	:	45 Std.

Abb. 7. Gamma-Myelom (Pat. Mü.)

Die außen liegende Gamma-Myelomfraktion läßt eine geringere Wanderungsgeschwindigkeit als das Gamma-Normalglobulin erkennen.

Folienformat	:	39 mm x 155 mm
Veronalpuffer	:	p_H 8,6 Ionenstärke 0,05 Verdünnung 1:1
Serum	:	5×10^{-3} ml
IEP-Anti-Humanserum	:	5×10^{-2} ml (unverdünnt)
Trennzeit	:	160 Min.
Gleichspannung	:	200 Volt
Diffusionszeit	:	46 Std.

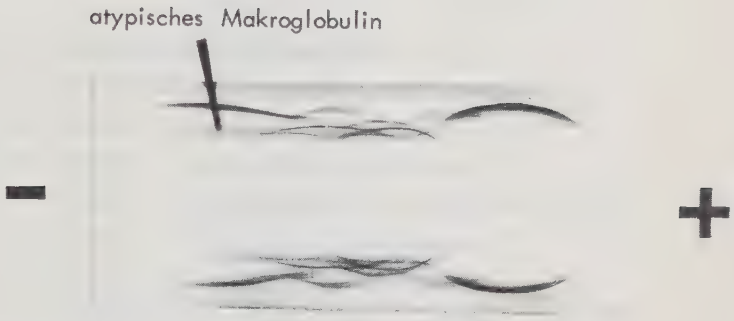


Abb. 8. Makroglobulinämie (Pat. Schw., 3 J.)

Atypisches Makroglobulin im Gamma-Bereich

Folienformat	:	39 mm x 155 mm
Veronalpuffer	:	p_H 8,6 Ionenstärke 0,05 Verdünnung 1:1
Serum	:	4×10^{-3} ml
IEP-Anti-Humanserum	:	5×10^{-2} ml (Verd. 7:2)
Trennzeit	:	160 Min.
Gleichspannung	:	200 Volt
Diffusionszeit	:	48 Std.

B. Die immunoelektrophoretische Darstellung der Serum-Lipoproteide auf Membranfolien unter Verwendung monospezifischer Anti-Lipoproteidseren

In der vorliegenden Arbeit wird erstmals der Nachweis von Serum-Lipoproteiden auf Membranfolien mittels immunologischer Technik beschrieben. Auf der einen Seite der Folie wird das normale Antigenverteilungsmuster des untersuchten Serums unter Verwendung eines Anti-Humanserums dargestellt. Auf der Gegenseite wird jeweils ein Lipoproteid unter Verwendung des spezifischen Antiserums gezeigt. Auf diese Weise ist eine exakte Zuordnung der einzelnen Lipoproteidfraktionen in die entsprechenden Proteinbereiche möglich.

Unter Verwendung eines Anti-$Alpha_1$ - Lipoproteid-Serums (Hersteller Behringwerke) erhält man eine flach verlaufende Präzipitationslinie, die im Albuminbereich beginnt und sich bis hin zur $Alpha_2$ - Globulin-Fraktion erstreckt. Die $Alpha_1$ - Linien färben sich bei Normalseren infolge des geringen Eiweißanteils der $Alpha_1$ - Lipoproteide nur sehr schwach an. Dagegen kann bei essentieller Hyperlipämie eine stark angefärbte Präzipitationslinie beobachtet werden. In Abb. 9 ist dieser Befund dargestellt.

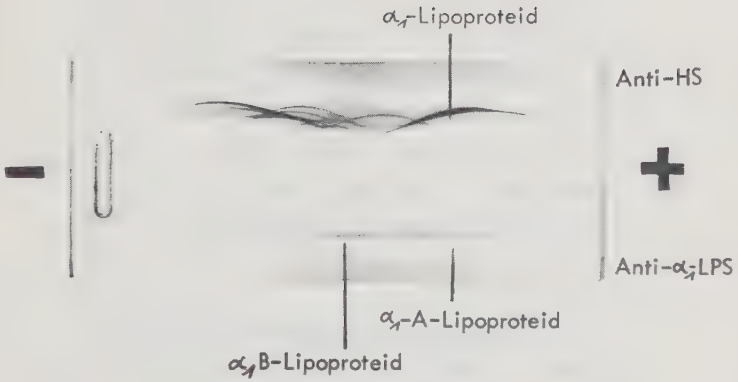


Abb. 9. Essentielle Hyperlipämie (Pat. Fei.)

oben: die mit Hilfe eines IEP-Anti-Human-serums erhaltene Präzipitatbildung

unten: die mittels eines Anti-Alpha$_1$-Lipoproteidserums (Behringerwerke) dargestellte Alpha$_1$-Lipoproteid-Fraktion.

Folienformat	:	39 mm x 155 mm
Veronalpuffer	:	p_H 8,6 Ionenstärke 0,05 Verdünnung 1:1
Serum	:	5×10^{-3} ml
IEP-Anti-HS	:	5×10^{-2} ml (Verd. 7:3)
Anti-Alpha$_1$-LPS	:	4×10^{-2} ml (unverdünnt)
Trennzeit	:	160 Min.
Gleichspannung	:	200 Volt
Diffusionszeit	:	48 Std.

Aus der Abb. 9 wird deutlich, daß sich ein Anteil der $Alpha_1$-Lipoproteide im Albuminbereich befindet und deshalb auch die gleiche Wanderungsgeschwindigkeit wie das Albumin besitzen muß. In der Fortsetzung dieses Hauptanteils erstreckt sich eine weitere, von der ersteren deutlich abgesetzte Komponente infolge geringerer Wanderungsgeschwindigkeit bis in den $Alpha_2$-Bereich. Aufgrund dieser immunologischen Befunde kann die Existenz zweier $Alpha_1$-Fraktionen bestätigt werden (4,5,).

Die unterschiedliche Lage der $Alpha_1$-B-Fraktion im Vergleich zur Agartechnik ist auf die unterschiedlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften der beiden Trägermedien zurückzuführen.

Das $Alpha_2$-Lipoproteid stellt sich unter Anwendung eines Anti-$Alpha_2$-Lipoproteidserums als bogige Präzipitationslinie im Bereich der $Alpha_2$-Beta-Globuline dar. In Abb. 10 wird dieser Befund demonstriert.

Abb. 10. Normalserum

oben: die mit Hilfe eines IEP-Anti-HS erhaltene Präzipitatbildung

unten: die mittels eines Anti-Alpha$_2$-Lipoproteidserums (Behringwerke) dargestellte Alpha$_2$-Lipoproteid-Fraktion.

Folienformat	:	39 mm x 155 mm
Veronalpuffer	:	p_H 8,6 Ionenstärke 0,05 Verdünnung 1:1
Serum	:	6×10^{-3} ml
IEP-Anti-HS	:	5×10^{-2} ml (Verd. 7:2)
Anti-Alpha$_2$-LPS	:	4×10^{-2} ml (unverd.)
Trennzeit	:	160 Min.
Gleichspannung	:	200 Volt
Diffusionszeit	:	46 Std.

Unter Verwendung von Anti-Beta-Lipoproteidserum stellt sich im Bereich der $Alpha_2$-Beta-Globuline das Beta-Lipoproteid dar. Reproduzierbare Befunde zeigen gleichzeitig medial von der Beta-Präzipitationslinie die etwas stärker gekrümmte, schwach angefärbte Linie des $Alpha_2$-Lipoproteids (Abb. 11).

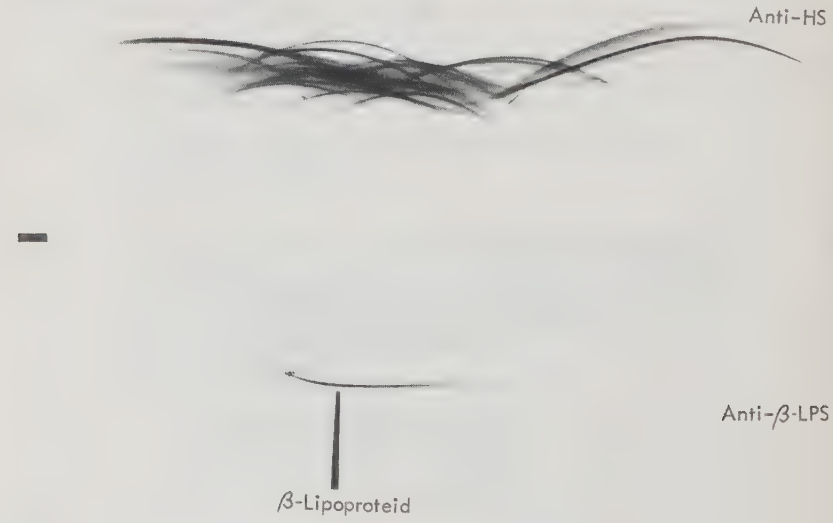


Abb. 11. Normalserum

oben: die mit Hilfe eines IEP-Anti-HS erhaltene Präzipitatbildung.

unten: die mittels eines Anti-Beta-Lipoproteid-serums (Behringwerke) dargestellte Beta-Lipoproteid-Fraktion, medial davon das schwach angefärbte $Alpha_2$-Lipoproteid.

Folienformat	:	39 mm x 155 mm
Veronalpuffer	:	p_H 8,6 Ionenstärke 0,05 Verdünnung 1:1
Serum	:	6×10^{-3} ml
IEP-Anti-HS	:	5×10^{-2} ml (Verdünnung 7:3)
Anti-Beta-LPS	:	4×10^{-2} ml (unverdünnt)
Trennzeit	:	160 Min.
Gleichspannung	:	200 Volt
Diffusionszeit	:	47 Std.

Dieser Befund spricht dafür, daß die Proteinanteile beider Lipoproteidfraktionen immunologisch verwandt sind. Die Präzipitationslinie der Beta-Lipoproteidfraktion ist in der Regel weniger gekrümmt und etwas länger gestreckt als die der $Alpha_2$-Lipoproteidfraktion.

Aufgrund der gezeigten Befunde ist eine immunologische Darstellung der Lipoproteide mit dieser Methode ohne weiteres möglich.

Durch gleichzeitige Gegenüberstellung des vollständigen Antigenmusters der untersuchten Seren sind mit der angegebenen Methodik jederzeit gute Vergleichsmöglichkeiten gegeben.

Diskussion

Die vorliegenden immunologischen Resultate beweisen, daß die Membranfolien unter Anwendung der beschriebenen Arbeitstechnik sehr gut für Immunoelektrophoresen geeignet sind.

Daß die Anwendung von Acetatfolien in den Kliniken noch keine allgemeine geworden ist, dürfte in erster Linie auf den vermeintlich hohen Kostenaufwand und auf Schwierigkeiten der Anwendungstechnik zurückzuführen sein. Dazu muß gesagt werden, daß durch die Verwendung von Kleinformaten der Kostenaufwand erheblich reduziert werden kann. Schwierigkeiten der Anwendung werden durch eine geeignete Methodik und sorgfältiges Arbeiten schnell überwunden. Entscheidend für die Einführung der Folien in die Routinediagnostik sollten vielmehr ihre Vorteile gegenüber anderen Trägermedien sein.

Immunoelektrophoresen werden derzeit im Agar ausgeführt. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß Membranfolien als Trägermedium dem Agar-Gel ebenbürtig, in einigen Punkten sogar überlegen sind.

Die Vorteile gegenüber der gebräuchlichen Agarmethode sind nach KOHN (11,12) und eigenen Erfahrungen folgende:

a) Membranfolien sind stets gebrauchsfertig
b) größere Schärfe der Präzipitationslinien

c) die Präparate können für Dokumentationszwecke besser aufbewahrt werden als getrocknete Agarstreifen.

Einziger Nachteil der Membranfolien ist die Tatsache, daß die Bildung der Präzipitationslinien während des Diffusionsvorganges nicht beobachtet werden kann.

Zur Verhinderung des Bakterienwachstums sollte immer ein Konservierungsmittel hinzugesetzt werden. Außer Merfen können auch Lösungen von Merthiolat oder Thymol Verwendung finden.

J. KOHN berichtet, daß es zweckmäßig sei, die Folien mit einer etwa 20 % höheren Pufferkonzentration zu tränken als der zur Elektrophorese benutzten (14). Dem Vorschlag wurde durch vergleichende Untersuchungen Rechnung getragen. Dabei zeigte sich, daß die Anfeuchtung der Folien bei höherer Pufferkonzentration keine wesentlichen Vorteile bringt. Wichtig ist dagegen, daß die Pufferlösung nach fünf Elektrophoresen erneuert wird, um die Qualität der Trennungen nicht zu beeinträchtigen.

Von englischen Fabrikaten ist bekannt, daß Elektrophoresestreifen gelegentlich Wölbungen durch Hochstehen ihrer Längskanten aufweisen. Dieses Phänomen wurde bei Membranfolien nicht beobachtet.

Für das Gelingen der elektrophoretischen Trennung ist das Auftragen der Serumprobe entscheidend.
Das Serum muß im Bereich der Startlinie an jeder Stelle gleichmäßig aufgesogen werden. Jede Unregelmäßigkeit in der Auf-

tragung verhindert eine optimale Trennung.

Wichtig ist, daß nach Aufbringen der Folien auf die Immunobrücken eine genügende Streifenspannung erreicht wird. Dazu dürfte die Elektrophoresekammer nach KOHN (6,14) mit eingearbeiteten Streifenhaltern besser geeignet sein als die Immunokammer der Firma Bender & Hobein, München.

Eine genügend lange Trennzeit ist erforderlich, um bei der Immunodiffusion ein Optimum an Präzipitationslinien in den entsprechenden Proteinbereichen zu erhalten.

Nach der üblichen Trennung wurde das Antiserum mittels Filtrierpapierstreifen aufgetragen. J. KOHN verwendet dazu eine feine Kapillare, die entlang eines Lineals geführt wird (14). Die angegebene Technik mit serumgetränkten Filtrierpapierstreifen erbrachte gleichwertige Ergebnisse.
Außerdem ist sie leichter ausführbar.

Die Membranfolien wurden nach Auftragen des Anti-Serums in feuchte Kammern gebracht. R. CONSDEN und J. KOHN bevorzugten das Einlegen der Membranfolien in Paraffinöl (6), da es nach ihrer Meinung in einer feuchten Atmosphäre nicht möglich sei, eine ungleiche Verdunstung von der Membranoberfläche zu vermeiden. Diesem Einwand muß entgegengehalten werden, daß bei konstantem Feuchtigkeitsgehalt über 95 % keine Artefakte oder verzerrte Linien zu beobachten sind. Allerdings muß eingeschränkt werden, daß dazu eine Feuchtigkeitskontrolle mit dem Hygrometer und ein absolut luftdichter Abschluß der Kammer erforderlich sind.

Die durchgeführten Untersuchungen lassen nicht darauf

schließen, daß die Kohn´sche Technik gegenüber der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen besondere Vorzüge garantiert.

Die in den Abbildungen gezeigten Befunde sind jederzeit reproduzierbar.

Südhof teilte mit, daß die Darstellung der Präzipitationslinien auf Membranfolien vor allem die Proteine des $Alpha_2$-, Beta- und Gamma-Bereiches betreffe, und die schneller wandernden Proteine nur in unvollkommenem Ausmaß dargestellt werden (21). Dagegen beweisen die gezeigten Befunde eindeutig, daß unter optimalen Trennbedingungen auch die Präzipitationslinien im $Alpha_1$-Bereich sehr deutlich nachweisbar sind.

Die im Schrifttum veröffentlichten Immunoelektrophoresen lassen gelegentlich Diffusionsartefakte und vereinzelt Mikroorganismen erkennen.
Diese Fehler können nur durch genügende Sorgfalt in der Arbeitstechnik vermieden werden.

Übereinstimmend mit allen Arbeiten über Acetatfolien kann bestätigt werden, daß die Ergebnisse jedem Vergleich mit anderen Trägermedien standhalten und in zahlreichen Punkten sogar überlegen sind (15).

Die Acetatfolie liefert ein Fraktionierungsergebnis, wie es auch mit Papierstreifen erhalten wird. Damit ist ein direkter Vergleich der mit den beiden Trägermedien gewonnenen Resultate möglich. Demgegenüber erhält man bei der Trennung im Agar ein zwar ähnliches, in einigen Punkten aber doch

von der eben genannten Technik abweichendes Fraktionierungsresultat. Agar bewirkt infolge seines großen Molekulargewichtes und seiner physikalisch-chemischen Eigenschaften einen relativ großen elektro-osmotischen Effekt mit einer kathodischen Wanderung des Gamma-Globulins, was bei der Acetatfolie nicht der Fall ist. Ferner werden manche Proteinkomponenten in ihrer Wanderungsgeschwindigkeit durch die Agareigenschaften so beeinflußt, daß sie eine andere Position als bei der Trennung auf Papier oder Acetatfolien aufweisen. Das gilt besonders für die Lipoproteide. Die Immunoelektrophorese auf Acetatfolien schaltet diese Faktoren aus.

Die Beurteilung immunoelektrophoretischer Analysen auf Acetatfolien darf sich nicht auf Vergleiche mit der Agartechnik stützen. Vielmehr müssen normale Antigenverteilungsmuster auf Folien zur kritischen Interpretation der pathologischen Befunde herangezogen werden.

Zusammenfassung

In Anlehnung an die Angaben von KOHN wird eine detaillierte Methodik zur immunoelektrophoretischen Analyse von Proteinen auf Acetatfolien beschrieben.

Die Brauchbarkeit der Methode wird am Beispiel normaler und pathologischer Seren demonstriert. Mit den handelsüblichen Anti-Humanseren ließen sich bis zu 20 Präzipitationslinien nachweisen.

Unter Verwendung spezifischer Anti-Lipoproteidseren konnten auch die Serumlipoproteide mit dieser Technik dargestellt werden.

Die Immunoelektrophorese auf Acetatfolien erlaubt eine direkte Zuordnung von Unterfraktionen zu den klassischen Hauptfraktionen, wie sie mit der Papierelektrophorese erzielt werden.

Die Verwendung von Acetatfolien für die Immunoelektrophorese bietet gegenüber der Agarmethode gewisse Vorteile.

Die Folien sind stets gebrauchsfertig, die Präzipitationslinien zeichnen sich durch eine außerordentliche Schärfe aus und die Präparate können für Dokumentationszwecke aufbewahrt werden.

Literatur

1. Berg, G.

Serumlipoproteide und Fett-Transport.
Fette in der Medizin, Fünfte Folge, Seite 33 - 35
Lochham 1965, Pallas Verlag

2. Berg, G.

Über elektrophoretische und immunologische Untersuchungen an Serumlipoproteiden.
Ärztl. Lab. 11, 298 - 303 (1965)

3. Berg, G.

Die diagnostische Bedeutung der Lipid-Elektrophorese für die Beurteilung von Störungen des Lipid-Stoffwechsels
Z. Klin. Chem./1. Jahrgang 1963/Heft 2, 48 - 51

4. Berg, G. und G. Willital

Untersuchungen über den Fett-Transport im Serum mit der Lipoidelektrophorese auf Membranfolien.
Klin. Wschr. 1965

5. Berg, G. und P. Rudolf

Über die Lipidelektrophorese auf Membranfolien.
Med. Welt 1965

6. Consden, R. und J. Kohn

Cellulose acetate as a medium for immuno-diffusion.
Nature 183, 1512 (1959)

7. Götz, H./G. Berg und F. Scheiffarth

Methodische Grundlagen der Immunoelektrophorese.
Z. Immun. Forsch. 114, 72 (1957)

8. Grabar, P. und P. Burtin

Immunoelektrophoretische Analyse. Ihre Anwendung
auf die Untersuchung menschlicher Körperflüssigkeiten.
Elsevier, Amsterdam/London/New York, 1964

9. Grunbaum, B. und L. Long

Immunoelektrophoresis with cellulose acetate.
Nature 194, 185 (1962)

10. Henning, N.

Klinische Laboratoriumsdiagnostik
Urban & Schwarzenberg, München-Berlin,
3. Auflage, 1966

11. Kohn, J.

Immuno diffusion technique on cellulose acetate.
Protides of the Biological Fluids, Brügge 1961

12. Kohn, J.

An immuno electrophoretic technique.
Nature 180, 986 (1957)

13. Kohn, J.

Small-scale and micro-membrane filter-electro-phoresis
and immuno electrophoresis.
Protides of the Biological Fluids, 6. Colloquim
Brügge 1958, Seite 74 (erschienen 1959)

14. Kohn, J.

in " Chromatographic and electrophoretic Techniques ", Vol. II, Zone electrophoresis, Seite 56
Cellulose acetate elctrophoresis and immuno diffusion techniques. Ivor Smith
William Heinemann, Medical books Ltd. London 1960

15. Maier, K. H. und K. Voggel

Ein neues Trägermaterial für die elektrophoretische Auftrennung.
Z. anal. Chem. 186, 257 (1962)

16. Nelson, T. L., Garland Stroup und R. Weddell

Immuno electrophoretic identification of human serum proteins on a cellulose-acetate medium.
American Journal of Clinical Pathology,
Vol. 42, No. 3, 237 (1964)

17. Oriol - Bosch, K. D. Voigt

Untersuchungen zur elektrophoretischen Trennung von Serumeiweißkörpern an einer Cellulose-Acetat-Folie.
Protides of the Biological Fluids, 7. Colloquium, Brügge 1959, Seite 332

18. Pieper, J.

Untersuchungen über Membranfolien als Trägermaterial in der Elektrophorese.
Klin. Wochenschrift 39, 1239 (1961)

19. Scheiffarth, F., G. Berg, H. Götz

Papierelektrophorese in Klinik und Praxis.
Urban & Schwarzenberg, München-Berlin 1962

20. Schwick, G.

Die Technik der Immuno-Elektrophorese.
Laboratoriumsblätter 8, 11-21 (1958)

21. Südhof, H. und B. Walter

Die immunoelektrophoretische Technik auf der Cellulose-Acetat-Folie.
Clinica Chim. Acta 8, 434 (1963)

An dieser Stelle sei Herrn
Prof. Dr. N. Henning für die
Übernahme des Referates
herzlichst gedankt.

Für die Überlassung des Themas
und die Unterstützung, die mir
bei der Durchführung dieser Arbeit
zuteil wurde, schulde ich Herrn
Oberarzt Priv.-Doz. Dr. G. Berg
ganz besonderen Dank.

Lebenslauf

Als Sohn des Geschäftsinhabers Max Grabner und seiner Ehefrau Alice, geb. Kempt, wurde ich am 1.10.1935 in Aue geboren. Von 1942 - 1950 besuchte ich in meiner Heimatstadt Zwönitz die Grundschule, anschließend in Stollberg die Oberschule, wo ich Ende 1954 das Abitur ablegte. Danach wollte ich Medizin studieren, wurde jedoch als parteiloser Bewerber abgelehnt. Deshalb füllte ich zunächst die Zeit mit Arbeiten in der Krankenpflege aus. Als mir schließlich in Aussicht gestellt wurde, den Weg zum Studium durch eine mehrjährige Tätigkeit in den sog. " Nationalen Streitkräften " zu erreichen, ging ich nach Westberlin, wo ich als Ostschüler in Ergänzung zum Ost- das Westabitur ablegen mußte. 1959 schrieb ich mich an der FU in Berlin zum Medizinstudium ein. Nach dem Vorphysikum 1960 ging ich nach Erlangen, wo ich 1961 das Physikum und Anfang 1965 das Staatsexamen bestand.

Seit April 1965 arbeite ich als Medizinalassistent in der Medizinischen Universitätsklinik Erlangen.

Buchdruck und Fotodruck: Ludwig Müller, Erlangen, Fahrstraße 5